

Rev.MVZ Córdoba 20(1):4482-4487, 2015. ISSN: 0122-0268

COMUNICACIÓN BREVE

The search for the *mdr1-1Δ* mutation of the *MDR1* gene in four canine breeds in Uruguay (preliminary study)

Búsqueda de la mutación *mdr1-1Δ* del gen *MDR1* en cuatro razas caninas en Uruguay (estudio preliminar)

Rosa Gagliardi B,^{1*} M.Sc, Diana Martínez A,² MV, Beatriz Tellechea H,² MV, Pedro Sitjar Q,² MV, Silvia Llambí D,¹ Ph.D, María Arruga L,³ Ph.D.

¹Universidad de la República, Facultad de Veterinaria, Área Genética. Montevideo, C.P. 11600, Uruguay.

²Veterinarios con ejercicio liberal de la profesión. ³Universidad de Zaragoza, Facultad de Veterinaria, Laboratorio de Citogenética y Genética Molecular. Zaragoza, C. P. 50013, España. *Correspondencia: rgagliar@gmail.com

Received: May 2014; Accepted: October 2014.

ABSTRACT

Objective. The objective of this study is to analyze the frequency of *mdr1-1Δ* mutation in German Shepherd, Doberman, Border Collie and Greyhound dog breeds in Uruguay. **Materials and methods.** A total of 95 animals from the four breeds mentioned above were studied. DNA was isolated from blood using potassium acetate with a subsequent degradation from RNA with RNAsaH. The concentration and quality of the DNA obtained was evaluated with a Nanodrop, ND-1000 spectrophotometer. To determine the presence or absence of the *mdr1-1Δ* mutation, DNA samples were sent to Gene Seek, Neogen Corporation of Chicago, United States, for genotyping. **Results.** In all 95 animals studied, the *mdr1-1Δ* mutation was not present. **Conclusions.** Based on the preliminary results obtained, other elements that may cause adverse drug reactions must be considered: unidentified mutations in other regions of the *MDR1* gene; mutations in other genes involved in the transport of drugs from the same subfamily or another; mutations in enzymes involved in drug metabolism (e.g. Cytochrome P450). Moreover, especially with Border Collies and Greyhounds, it is advisable to increase the number of animals in the study.

Key words: Dogs, ivermectine, P-glycoprotein (*Source: CAB*).

RESUMEN

Objetivo. En este trabajo se realizó la búsqueda de la mutación *mdr1-1Δ* en caninos de las razas Ovejero Alemán, Doberman, Galgo y Border Collie de Uruguay. **Materiales y métodos.** Se estudió un total de 95 animales, de las cuatro razas caninas mencionadas. El ADN se aisló a partir de muestras sanguíneas empleando acetato de potasio 8M con posterior degradación de ARN con RNAsaH. Se evaluó la concentración y calidad del ADN en un espectrofotómetro Nanodrop, ND-1000. Para conocer la presencia o ausencia de la mutación *mdr1-1Δ*, los ADN de las muestras extraídas se enviaron a *Gene Seek*, (*Neogen Corporation*) de Chicago, Estados Unidos. **Resultados.** En ninguno de los 95 animales estudiados se encontró la mutación *mdr1-1Δ*. **Conclusiones.** Dados los resultados preliminares obtenidos, se deberían considerar otros elementos que puedan causar reacciones adversas a fármacos: mutaciones aun no identificadas en otras regiones del gen *MDR1*; mutaciones en otros genes que intervengan en el transporte de medicamentos de la misma subfamilia u otra; mutaciones en enzimas que participan en el metabolismo de los medicamentos (ej. Citocromo P450). Por otra parte, y en particular en las razas Border Collie y Galgo es aconsejable aumentar el número de animales en estudio.

Palabras clave: Glucoproteína-P, ivermectina, perros (*Fuente: CAB*).

INTRODUCTION

Antiparasitic treatments in canines, both external and internal, are one of the routine tasks in a Veterinary Clinic. Different types of drugs are used for this treatment. Macrocyclic lactone is part of a family of endectocides antiparasitics that has frequently been used, particularly ivermectine. It increases the release and union of gamma-amino butyric acid (GABA) in nerve synapses, provoking the blockage of transmission impulses and paralysis of the parasite. GABA is an inhibiting neurotransmitter in the nervous system of nematodes and arthropods, while in mammals it acts on the central nervous system (CNS). In these latter ones the blood-brain barrier plays a protective role in preventing xenobiotics from entering, and for this reason drugs such as ivermectine present a wide safety margin.

P-glycoprotein, part of said barrier, is responsible for transporting different compounds outside the CNS and plays, in this case, a protective role (1). Starting in the 1980s, when ivermectine began to be used as an antiparasitic, cases began to be reported of canines that had neurologic symptoms (lethargy, ataxia, coma, blindness, convulsions, etc.) which resulted in respiratory paralysis and death of the animal. Generally Collies, Shetland Sheepdogs, Australian Shepherds, White Shepherds, Longhaired Whippets or dogs interbred with these breeds were affected. It was later seen that these animals lacked functional P-glycoprotein, caused by the presence of a 4pb deletion (*mdr1-1Δ* mutation) in the gene that codifies it (*MDR1*: multiple drug resistant gene) (2-5).

Merola et al (1) performed drug neurotoxicity communications on different breeds and mixed breeds of dogs, including some where the abovementioned mutation has not been detected. Among the breeds that have been studied are German Shepherds, Dobermans, Border Collies and Greyhounds. Of these breeds, the one that showed *mdr1-1Δ* mutation was Border Collies and some breeds related to Greyhounds. In spite of these findings, it is important to consider that in some of these studies very few animals were analyzed (Doberman: 2 cases) (1).

In this study, the preliminary search for *mdr1-1Δ* mutation in canines of the German Shepherd, Doberman, Greyhound and Border Collie breeds in Uruguay is carried out.

INTRODUCCIÓN

Los tratamientos antiparasitarios, tanto contra parásitos externos como internos en caninos, son uno de los manejos de rutina en la Clínica Veterinaria. Con este fin se emplean diferentes clases de fármacos. La familia de las lactonas macrocíclicas es una familia de antiparasitarios endectocidas que se ha empleado frecuentemente, en particular la ivermectina. El modo de acción de la misma es aumentar la liberación y unión del ácido gamma-amino butírico (GABA) en las sinapsis nerviosas; provocando que se bloquee la transmisión de impulsos y la parálisis del parásito. El GABA es un neurotransmisor inhibidor en el sistema nervioso de nematodos y artrópodos, mientras que en mamíferos actúa en el sistema nervioso central (SNC). En estos últimos la barrera hematoencefálica cumple una función protectora evitando el ingreso de xenobióticos, de esta manera fármacos como la ivermectina presentan un amplio margen de seguridad.

La glucoproteína-P, parte de dicha barrera, responsable de transportar diferentes compuestos fuera del SNC, cumple, en este caso, una función de protección (1). A partir de la década de 1980; momento en que se comenzó a usar la ivermectina como antiparasitario, se empezaron a comunicar casos de muerte de perros que presentaban sintomatología neurológica (letargia, ataxia, coma, ceguera, convulsiones, etc.) terminando en una parálisis respiratoria, con muerte del animal. Estos animales generalmente eran de la raza Collie, Shetland Sheepdog, Australian Shepherd, White Shepherd, Longhaired Whippet, o perros cruzados con estas razas. Posteriormente se vio que estos animales carecían de una glucoproteína-P funcional: hecho causado por la presencia de una delección de 4pb (mutación *mdr1-1Δ*) en el gen que la codifica (*MDR1*: gen de resistencia múltiple a fármacos)(2-5).

Merola et al (1), realizaron comunicaciones de neurotoxicidad a fármacos en perros de diferentes razas y mestizos; incluyendo algunas donde no se ha descrito la mutación mencionada. Entre las razas que se han estudiado se encuentran el Ovejero Alemán (Pastor Alemán), Doberman, Border Collie, Galgo. De estas razas, en las que se describió la mutación *mdr1-1Δ* fue en Border Collie y en algunas razas relacionadas al Galgo. Pese a estos hallazgos, es importante considerar que en algunas de ellas se han analizado muy pocos animales (Doberman: 2 casos) (1).

En este trabajo se realiza la búsqueda preliminar de la mutación *mdr1-1Δ* en caninos de las razas Ovejero Alemán, Doberman, Galgo y Border Collie de Uruguay.

MATERIALS AND METHODS

Samples analyzed. A total of 95 animals from four breeds were studied: German Shepherd (34 animals), Doberman (31 animals), Greyhound (21 animals) and Border Collie (9 animals). The samples were random, from different regions of the country, particularly to the south, east and northeast (departments of Montevideo, Canelones, San José and Maldonado), due to animal density in these departments. Blood was drawn from the antero-brachial or saphenous vein, in conditions of asepsia, using K3 EDTA as an anticoagulant, preserved frozen until processed in the laboratory. Extractions were performed in the presence of the animal's owners, at their home or during a routine veterinary visit, with minimal stress, following CHEA regulations (Honorary Commission on Animal Experimentation).

DNA Isolating. DNA was isolated using an extraction technique with potassium acetate 8M and later degradation of RNA with RNaseH (6). A spectrophotometer (Nanodrop, ND-1000) was used to evaluate the concentration and quality of DNA obtained.

Search for the mutation. To find the genotype of the *MDR1* gene, DNA from extracted samples was sent to the *Gene Seek* laboratory, *Neogen Corporation* from Chicago, United States. In table 1 a sample from a region of the *MDR1* gene that includes the studied mutation is shown.

Table 1. *MDR1* gene region where nucleotides underlined are lost in presence of the *mdr1-1Δ* mutation.

```

TAGGTTGTATATGTTGGTGGGACAAATGGCTGCCATCATCCATGGAGCTG
CACTCCCTCTCATGATGCTGTTTGGAAACATGACAGATAGCTTTGCAA
ATGCAGGAATTTCAGAAACAACTTTCCAGTTATAATTAATGAAAGTAA

```

RESULTS

As can be seen in table 2, where as an example a sample is shown of the result of the genotypes of 10 of samples studied, none of the cases that were analyzed in this work presented the *mdr1-1Δ* mutation.

DISCUSSION

The absence of the *mdr1-1Δ* mutation in the 95 genotyped samples belonging to the four canine breeds could be due in first place to the low number of genotyped samples for each breed, considering that the frequency of the mutation

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestra analizada. Se estudió un total de 95 animales, de cuatro razas caninas: Ovejero Alemán (34 muestras), Doberman (31 muestras), Galgos (21 muestras) y Border Collie (9 muestras). Dichas muestras se tomaron al azar, de diferentes regiones del país, particularmente sur, este y noreste (departamentos de Montevideo, Canelones, San José y Maldonado). Esto se debió a la densidad de animales en esos departamentos. La sangre se extrajo de la vena antebraquial o de la safena, en condiciones de asepsia, empleando como anticoagulante K3 EDTA, conservándose congelada hasta su procesamiento en el laboratorio. Las extracciones se realizaron en presencia de los propietarios de los animales, en el domicilio o en una visita de rutina a la Veterinaria, con un estrés mínimo, siguiendo las normas de la CHEA (Comisión Honoraria de Experimentación Animal).

Aislamiento de ADN. El ADN se aisló empleando la técnica de extracción con acetato de potasio 8M y posterior degradación de ARN con RNaseH (6). Para evaluar la concentración y calidad del ADN obtenido se empleó un espectrofotómetro (Nanodrop, ND-1000).

Búsqueda de la mutación. Para conocer el genotipo para el gen *MDR1*, el ADN de las muestras extraídas se envió al laboratorio *Gene Seek*, *Neogen Corporation* de Chicago, Estados Unidos. En la tabla 1 se muestra una región del gen *MDR1* que incluye la mutación estudiada.

RESULTADOS

Según puede verse en la tabla 2, donde se muestra como ejemplo el resultado de los genotipos de 10 de las muestras estudiadas, en ninguno de los casos que se analizaron en este trabajo, se presentó la mutación *mdr1-1Δ*.

Table 2. Results of genotypes from 10 of the studied samples (*original results*).

BC3	AGAT	AGAT
BC4	AGAT	AGAT
BC5	AGAT	AGAT
G10	AGAT	AGAT
G11	AGAT	AGAT
GS1	AGAT	AGAT
GS2	AGAT	AGAT
D1	AGAT	AGAT
D2	AGAT	AGAT
D3	AGAT	AGAT

BC: Border Collie, G: Greyhound, GS: German Shepherd, D: Doberman.

is low. Merola (1) studied dogs of different races that presented sensibility to ivermectine. Among these dogs, 20% of cases with German Shepherds presented sensibility to the drug, and in Greyhounds, 7.6%. In these cases, a direct relation between the existence of sensibility and the administered dose of ivermectine is shown. Animals that have the studied mutation lack normal P glycoprotein, being susceptible to ivermectine even in the low doses (0.15 to 0.34 mg/kg) (1) used in routine treatments in veterinary clinics.

In reference to this study, the *mdr1-1Δ* mutation was sought in four breeds that have shown adverse reactions to ivermectine or that are related to the Collie Border breed.

In the case of German Shepherds, in the United States the *mdr1-1Δ* mutation was described specifically in white animals (7,8). In that country, white is a variety within the breed. On the other hand, in Europe the mutation has not been detected in German shepherds. However, white animals make up the White Swiss Shepherd breed, which *does* present the *mdr1-1Δ* mutation in an elevated frequency (2,3). In Uruguay, German Shepherds are found widely throughout the country. Additionally, White Swiss Shepherd is not clearly defined as a separate breed. The majority of the samples taken for this study correspond to the southeast area of the country, where there are no white animals. At any rate, it is unknown if the animals studied are related to animals of this color. These preliminary results lead to the prediction that the mutation problem would not be present in German Shepherds without the introgression of White Swiss Shepherds.

Regarding Dobermans, there is little previous information regarding the presence or absence of the *mdr1-1Δ* mutation (1). In spite of the fact that cases reporting sensitivity to the drug exist, the presence of the aforementioned mutation have not been communicated. In this breed, around the world, two cases of drug poisoning with ivermectine were discovered. In the first case, the animal accidentally ingested an excessive amount of the drug (1). This case was described in the 1990s, and since the mutation had not been described, its presence could not be determined. The second case involved animals with demodicosis that were treated with ivermectine and presented neurotoxicity. These cases were genotyped for the MDR1 gene, normal homozygotes for this gene (9).

In reference to Greyhounds, 23 samples were studied and all showed a negative result for

DISCUSIÓN

La ausencia de la mutación *mdr1-1Δ* en las 95 muestras genotipificadas pertenecientes a las cuatro razas caninas podría deberse en primer lugar, al bajo número de muestras genotipificadas para cada raza, considerando que la frecuencia de la mutación fuera relativamente baja. Merola (1) estudió perros de diferentes razas que presentaban sensibilidad a la ivermectina. Entre estos perros, de los Pastores Alemanes el 20% de los casos presentaba sensibilidad a dicho fármaco, y de los Greyhound el 7.6%. En estos casos, se encontró una relación directa entre la existencia de sensibilidad y la dosis de ivermectina administrada. Los animales que presentan la mutación estudiada, carecen de una glucoproteína P normal; siendo susceptibles a la ivermectina aún con dosis bajas (0.15 to 0.34 mg/kg) (1), usadas en tratamientos de rutina en la Clínica Veterinaria.

En lo que se refiere a este trabajo, se buscó la mutación *mdr1-1Δ*, en cuatro razas donde se han descrito reacciones adversas a la ivermectina o que están relacionadas a la raza Collie (Border Collie).

En el caso de los perros de raza Ovejero Alemán, en Estados Unidos, se describió la mutación *mdr1-1Δ*, específicamente en animales de color blanco (7,8). En este país, el blanco es una variedad dentro de la raza. Por otra parte, en Europa se ha comunicado que en pastores alemanes no se ha detectado la mutación. Sin embargo, los animales de la variedad de color blanco constituyen la raza Pastor Blanco Suizo, la que sí presenta la mutación *mdr1-1Δ* en una frecuencia elevada (2,3). En Uruguay, la raza Pastor Alemán se encuentra ampliamente difundida. A esto se suma el hecho de que el perro Pastor Blanco Suizo no presenta una separación clara de esta raza. La mayoría de las muestras extraídas en este trabajo corresponden al sureste del país, donde no se presentan animales de color blanco. De todas formas, se desconoce si los animales estudiados están relacionados con animales de este color. Estos resultados preliminares permiten predecir que la mutación problema no estaría presente en la raza Ovejero Alemán sin introgresión del Pastor Blanco Suizo.

En cuanto a la raza Doberman, existe poca información previa respecto de la presencia o ausencia de la mutación *mdr1-1Δ* (1). Pese a que se han descrito casos de sensibilidad a fármacos, no se ha comunicado la presencia de la mutación mencionada. En esta raza, a nivel mundial, se describieron dos casos de intoxicación farmacológica con ivermectina. En el primero de ellos, el animal ingirió accidentalmente una cantidad excesiva del fármaco (1). Este caso fue descrito en la década de 1990, por lo que al no haber estado descrita la mutación, no se pudo determinar su presencia. En el segundo caso se trató de animales con demodicosis que recibieron tratamiento con

the *mdr1-1Δ* mutation. According to previous studies (8), in certain breeds related to these animals (Longhair Whippet), the mutation is found in elevated frequencies at more than 40%. The fact that it was not found in the analyzed samples could be attributed to the fact that in our country there are no pure animals of this breed, since the majority are a cross between creole greyhound and English Greyhound, as well as others. At any rate, it would be important to increase the number of animals analyzed, considering the possibility that the mutation is rarely found in the population of greyhounds in our country. On the other hand, given the mix in the breed, it would be interesting to continue studying these animals in order to have a better idea of the situation respecting this mutation.

In the case of Border Collies, where 9 animals were studied, the *mdr1-1Δ* mutation wasn't found either. In this breed, Neff et al (8) described the absence of the mutation. Other authors (10) detected it in frequencies of only 0.6%. In Uruguay previous studies were done to analyze wild dogs and collies, finding the *mdr1-1Δ* mutation only in collies (11,12). Given the existing relationship between Border Collies and collies, where the studied mutation was first described, and the fact that there are authors that found it in very low frequency, it would be interesting to continue studying this breed and increase the number of sampled animals to know their situation in the country.

As previously mentioned, former studies (1) associated toxicity to ivermectine with the dose that was administered, and keeping in mind that in the four breeds that were studied there were cases of sensitivity to ivermectine, it was considered that drug sensitivity could be due to yet unidentified mutations in other regions of the *MDR1* gene, mutations in other genes that intervene in the transport of drugs from the same subfamily or another one, or mutations in enzymes that participate in the metabolism of these drugs (e.g. cytochrome P450) (9,13).

Based on the results obtained in this study and the elements previously mentioned, the possibility that animals from the studied breeds could present adverse reactions to drugs such as ivermectine cannot be discarded, and it is advisable for more studies to be done in order to be able to analyze different causes responsible for the mentioned drug sensitivity, among others. This acquires greater interest if the amount of drugs that underlie P glycoprotein are considered as well as the relationship this has to other types of treatments such as those with antitumor drugs.

ivermectina y presentaron neurotoxicidad. Estos fueron genotipificados para el gen *MDR1* siendo homocigotas normales para este gen (9).

En lo que se refiere a los Galgos, se estudiaron 23 muestras dando, todas ellas, un resultado negativo para la mutación *mdr1-1Δ*. Según estudios previos (8), en determinadas razas relacionadas a estos animales (Longhair whippet) la mutación se encuentra en frecuencias elevadas, de más del 40%. El no haberla encontrado en las muestras analizadas podría atribuirse a que en nuestro país no se encuentran animales puros de esta raza; siendo la mayoría cruza entre galgo criollo y greyhound (galgo inglés), además de otras. De todas formas sería importante aumentar el número de animales analizado, considerando la posibilidad de que en la población de galgos de nuestro país la mutación se encuentre en baja frecuencia. Por otra parte, dado el grado de mestizaje que presenta la raza, es de interés continuar estudiando estos animales con el fin de conocer con mayor exactitud su situación respecto de esta mutación.

En el caso de los Border Collie, raza en la que se estudiaron 9 animales, tampoco se encontró la mutación *mdr1-1Δ*. En esta raza, Neff et al (8) describieron la ausencia de la mutación. Otros autores (10) la detectaron en frecuencias de tan solo 0.6%. En Uruguay se realizaron estudios previos donde se analizaron perros cimarrones y animales de la raza Collie; encontrándose la mutación *mdr1-1Δ* únicamente en los Collie (11,12). Dada la relación existente entre los Border Collie y los Collie, donde se describió en primera instancia la mutación estudiada, y el hecho de que hay autores que la encontraron en muy baja frecuencia, interesa continuar estudiando esta raza y aumentando el número de animales muestreados para conocer la situación de la misma en el país.

Como se mencionó previamente, estudios anteriores (1) asocian la toxicidad de la ivermectina con la dosis a la que se administra, y teniendo en cuenta que en las cuatro razas estudiadas se describieron casos de sensibilidad a ivermectina, se consideró que la sensibilidad a fármacos podría deberse también a mutaciones aun no identificadas en otras regiones del gen *MDR1*; mutaciones en otros genes que intervengan en el transporte de fármacos de la misma subfamilia u otra; mutaciones en enzimas que participan en el metabolismo de los fármacos (ej. citocromo P450)(9,13).

Basados en los resultados obtenidos en este trabajo, y los elementos mencionados previamente, no se descarta la posibilidad de que animales de las razas estudiadas puedan presentar reacciones adversas a drogas como la ivermectina, siendo aconsejable realizar más estudios con el fin de poder analizar diferentes causas responsables de la sensibilidad al

Acknowledgments

The authors thank the Kennel Club Uruguayo (FVet, UdelaR agreement), the breeders of the animals that were studied, and individual veterinarians, all of whom worked to obtain samples of the animals studied.

fármaco mencionado entre otros. Esto adquiere mayor interés si se considera la cantidad de fármacos que son sustrato de la glucoproteína P y también la relación que esta tiene con otro tipo de tratamientos como son los tratamientos con fármacos antitumorales.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Kennel Club Uruguayo (convenio FVet, UdelaR), a criadores de las razas estudiadas y a veterinarios particulares. Todos los anteriores colaboraron en la obtención de las muestras de los animales estudiados.

REFERENCIAS

1. Merola V, Khan S, Gwaltney-Brant S. Ivermectin toxicosis in dogs: A retrospective study. *J Am Anim Hosp Assoc* 2009; 45 (3):106-111.
2. Gramer I, Leidolf R, Döring B, Klintzsch S, Krämer E-M, Yalcin E, Petzinger E, Geyer J. Breed distribution of the nt230 (del4) *MDR1* mutation in dogs. *Vet J* 2011; 189 (1):67-71.
3. Geyer J, Klintzsch S, Meerkamp K, Wöhlke A, Distl O, Moritz A, Petzinger E. Detection of the nt230 (del4) *MDR1* mutation in White Swiss Shepherd dogs: case reports of doramectin toxicosis, breed predisposition, and microsatellite analysis. *J Vet Pharmacol Therap* 2007; 30 (5):482-485.
4. Roulet A, Puel O, Gesta S, Lepage J-F, Drag M, Soll M, Alvinerie M, Pineau T. *MDR1*-deficient genotype in Collie dog hypersensitive to the P-glycoprotein substrate ivermectin. *European J of Pharmacol* 2003; 460 (2-3):85-91.
5. Mealey KL, Bentjen SA, Gay JM, Canthor GH. Ivermectin sensitivity in collies is associated with a deletion mutation of the *MDR1* gene. *Pharmacogenetics* 2001; 11 (8):727-733.
6. Fraga J, Rodríguez J, Fuentes O, Castex M, Fernández-Calienes A. Comparación entre 5 métodos para la extracción de ADN de triatomíneos: su utilización en la técnica de ADN polimórfico amplificado al azar *Rev Cubana Med Trop* 2004; 56 (3):208-13.
7. Mealey KL. Farmacogenética. *Clin Vet NA Med Peq Anim* 2006; 36 (5):961-973.
8. Neff MW, Robertson KR, Wong AK, Safra N, Broman KW, Slatkin M, Mealey KL, Pedersen NC. Breed distribution and history of canine *mdr1-1Δ* a pharmacogenetic mutation that marks the emergence of breed from the collie lineage. *Proc Nat Acad Sci* 2004; 101 (32):11725-11730.
9. Bissonnette S, Paradis M, Daneau I, Silverside DW. The *ABCB1-1Δ* mutation is not responsible for subchronic neurotoxicity seen in dogs of noncollie breeds following macrocyclic lactone treatment for generalized demodicosis. *Vet Dermatol* 2008; 20(1):60-66.
10. Geyer J, Döring B, Godoy JR, Leidolf R, Moritz A, Petzinger E. Frequency of the nt230 (del4) *MDR1* mutation in Collies and related dog breeds in Germany. *J Vet Pharmacol Therap* 2005; 28 (6):545-551.
11. Gagliardi R, García C, Llambí S, Arruga MV. Analysis of *mdr1-1Δ* mutation of *MDR1* gene in the "Cimarron Uruguayo" dog. *Rev MVZ Córdoba* 2013; 18(2):3480-3483.
12. Gagliardi R. Estudios genéticos en caninos de raza Cimarron Uruguayo (*Canis familiaris*). [Tesis de Maestría]. Montevideo: Universidad de la República, Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA); 2009.
13. Tomiyasu H, Goto-Koshino Y, Fujino Y, Ohno K, Tsujimoto H. Epigenetic regulation of the *ABCB1* gene in drug-sensitive and drug-resistant lymphoid tumour cell lines obtained from canine patients. *Vet J* 2014; 199 (1): 103-109.